

Considering the effect of luteinizing hormone receptor (LHR) polymorphisms (LHR) on their binding affinity to LH in dairy cows with the docking method

Mohammad Yahyaei^{1*}, Mahdi Khodaei Motlagh², Mohammad Hossein Moradi³

¹ Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, Iran, Email: m.yahyaei2008@gmail.com

² Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, Iran

³ Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, Iran,

Article Info

Article type:
Research Full Paper

Article history:
Received: 11/10/2021
Revised: 10/01/2022
Accepted: 12/01/2022

Keywords:
Amino acid
Dairy cow
LHR
Molecular docking
Polymorphism

ABSTRACT

Background and Objectives: Luteinizing hormone (LH) is one of the most important reproductive hormones that is secreted by the anterior pituitary gland and plays a key role in regulating the estrous cycle, maturation of ovarian follicles, ovulation, corpus luteum formation, corpus luteum development, and maintenance. The LH message is transmitted by binding it to its extracellular receptors, so that after binding to its receptor (LHR), LH activates the intracellular cascade chain by activating the secondary messenger cAMP, and ultimately the expression of specific proteins and enzymes. Therefore, the interaction of luteinizing hormone (LH) with its specific receptor (LHR) is one of the key steps in the path of follicular maturation and ovulation. Polymorphisms and LHR splicing are among the genetic changes that can affect LH function and consequent reproductive efficiency. The aim of this study was to compare the tertiary structure of different LHR polymorphisms and their binding affinity to LH in dairy cows.

Materials and Methods: For this purpose, LHR amino acid sequences were obtained from the Gene bank. Initially, Polymorphisms were identified by alignment analysis. Their related third structures were predicted by homology modeling technique using Modeller software. The created structures were observed and evaluated using PyMol 2.5.1 graphics software and Ramachandran plot. Also, different Physico-chemical parameters of the modeled proteins such as isoelectric point, molecular weight, number of negative and positive sequences, and Grand Average of hydropathicity (GRAVY) were calculated using the ProtParam tool in the Expasy database. Then, the affinity of LH to each of the LHR polymorphisms was evaluated using the molecular docking technique based on binding energy and spatial position indices.

Results: Based on the results, only two polymorphisms (LHR1 and LHR2) were identified among the studied sequences. The predicted models for the two polymorphisms have good quality and there was no difference in structural and physicochemical parameters between them. Docking results showed that, despite the difference in total binding energy between the two polymorphisms, this difference could not be attributed to amino acid substitution and this difference is probably related to an orientation of the LH relative to the LHR1 and LHR2. Most of the amino acids involved

in hydrogen bonding were similar in both the LH-LHR1 and LH-LHR2 complexes.

Conclusion: In general, the results of this study can be used to the relationship between LHR polymorphism and its physiological activity.

Cite this article: Yahyaei, M., Khodaei Motlagh, M., Moradi, M.H. (2022). Considering the effect of luteinizing hormone receptor (LHR) polymorphisms (LHR) on their binding affinity to LH in dairy cow with docking method. *Journal of Ruminant Research*, 10 (1), 35-48.



© The Author(s).

DOI: 10.22069/ejrr.2022.19569.1808

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

بررسی تأثیر چندشکلی‌های گیرنده هورمون لوتئینه‌کننده بر تمایل اتصال آنها به هورمون لوتئینه‌کننده در گاوشیری به روش داکینگ مولکولی

محمد یحیائی^{۱*}، مهدی خدائی مطلق^۲، محمدحسین مرادی^۳

۱. استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، رایانامه: m.yahyaei2008@gmail.com

۲. دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک

۳. دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله کامل علمی- پژوهشی	سابقه و هدف: هورمون لوتئینه‌کننده از جمله هورمون‌های مهم تولیدمثلی است که از لب پیشین هیپوفیز تراوش می‌شود و نقش کلیدی در تنظیم چرخه فعلی، بلوغ فولیکول‌های تخمدانی، تخمک‌ریزی، تشکیل جسم زرد، توسعه جسم زرد و نگهداری آن دارد. انتقال پیام هورمون لوتئینه‌کننده از طریق اتصال آن به گیرنده‌های برون‌سلولی صورت می‌گیرد به طوری که هورمون لوتئینه‌کننده بعد از اتصال به گیرنده خود از طریق فعال‌سازی پیامبر ثانویه آنوزین مونوفسفات حلقه‌ای منجر به فعال شدن زنجیره آبشاری درون سلولی و در نهایت بیان پروتئین‌ها و آنزیم‌های مخصوص می‌شود. لذا برهمکنش هورمون لوتئینه‌کننده با گیرنده اختصاصی خود یک از گام‌های کلیدی در مسیر بلوغ فولیکولی و تخمک‌ریزی آنها است. چندشکلی و ایزوفروم‌های مختلف گیرنده هورمون لوتئینه‌کننده از جمله تغییرات ژنتیکی می‌باشند که می‌توانند بر عملکرد هورمون لوتئینه‌کننده و متعاقباً بازدهی تولیدمثلی تأثیرگذار باشند. هدف از انجام این پژوهش مقایسه چندشکلی‌های مختلف گیرنده هورمون لوتئینه‌کننده از نظر ساختار سوم پروتئینی و تمایل برهمکنش آنها با هورمون لوتئینه‌کننده در گاو شیری بود.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۷/۱۹ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۰/۱۰/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۲۲	
واژه‌های کلیدی: اسیدآمینو چندشکلی داکینگ مولکولی	
گیرنده هورمون لوتئینه‌کننده گاوشیری	مواد و روش‌ها: به‌منظور انجام پژوهش، توالی‌های اسیدآمینو گیرنده هورمون لوتئینه‌کننده از بانک ژن گرفته شد. در ابتدا چندشکلی‌ها با آنالیز هم ترازوی شناسایی شدند. ساختارهای سوم مربوط به آنها با روش همولوژی مدلینگ و با استفاده از نرم‌افزار مدار پیش‌بینی شد. ساختارهای ایجادشده با استفاده از نرم‌افزار گرافیکی پایمول و نمودار رامانچاندرا-مورد مشاهده و ارزیابی قرار گرفتند. همچنین شاخص‌های مختلف فیزیکی-شیمیایی پروتئین‌های مدل شده مانند نقطه ایزوالکتریک، وزن مولکولی، تعداد دنباله‌های منفی و مثبت و میزان آبگریزی با استفاده از ابزار ProtParam در پایگاه Expasy محاسبه گردید. در ادامه میزان تمایل هورمون لوتئینه‌کننده به هرکدام از چندشکلی‌های گیرنده خود با استفاده از تکنیک داکینگ مولکولی و بر پایه دو شاخص موقعیت فضایی و انرژی اتصال مورد ارزیابی قرار گرفت.
	یافته‌ها: براساس نتایج بدست آمده تنها دو چندشکلی (نوع ۱ و نوع ۲) در میان توالی‌های مورد مطالعه شناسایی شد. مدل‌های ایجاد شده برای دو چندشکلی از کیفیت مناسبی برخوردار بودند و تفاوتی در شاخص‌های ساختاری و فیزیکوشیمیایی بین آنها مشاهده نشد. نتایج داکینگ نشان داد علی‌رغم تفاوت

انرژی اتصال کل در دو چندشکلی، این تفاوت را نمی‌توان به جایگزینی اسیدآمینه ارتباط داد و احتمالاً این اختلاف مرتبط با تفاوت جزئی در جهت‌گیری هورمون لوئتینه‌کننده نسبت به چندشکلی‌های نوع ۱ و نوع ۲ می‌باشد. بخش زیادی از اسیدآمینه‌های درگیر در پیوند هیدروژنی در برهمکنش هورمون لوئتینه‌کننده با چندشکلی‌های نوع ۱ و نوع ۲ مشابه بودند.

نتیجه‌گیری: به‌طور کلی نتایج حاصل از این مطالعه می‌تواند نقش مؤثری در درک رابطه چندشکلی‌گیرنده هورمون لوئتینه‌کننده و فعالیت فیزیولوژیک ناشی از آن داشته باشد.

استناد: یحیائی، م.، خدائی مطلق، م.، مرادی، م.ح. (۱۴۰۱). بررسی تأثیر چندشکلی‌های گیرنده هورمون لوئتینه‌کننده بر تمایل اتصال آنها به هورمون لوئتینه‌کننده در گاو‌شیری به روش داکینگ مولکولی. پژوهش در تشخیص‌ارکنندگان، ۱۰ (۱)، ۳۴-۴۸.

DOI: 10.22069/ejrr.2022.19569.1808



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

بازدهی تولیدمثلی از مؤلفه‌های مهم و تعیین‌کننده سودآوری در صنعت گاو‌شیری است. بازدهی تولیدمثلی تحت تأثیر عملکرد مستقل و متقابل هورمون‌های تولیدمثلی و غیرتولیدمثلی است. هورمون لوتینه کننده (LH^1) از جمله هورمون‌های مهم تولیدمثلی با ماهیت گلیکوپروتئینی (۲۵ کیلوالتون) است که نقش کلیدی در کنترل فعالیت گنادها دارد و در سلول‌های گونادوتروپ آدنوهیپوفیز ساخته می‌شود. گیرنده هورمون LH (LHR^2) سلول‌های تیکای درونی، گرانولوزا و جسم زرد دارند از این رو این هورمون در تنظیم چرخه فحلی، بلوغ فولیکول‌های تخمدانی، تخمک‌ریزی، تشکیل جسم زرد و نگهداری آن نقش دارد (۱، ۲). نقش آفرینی کارآمد LH وابسته به فاکتورهای مختلفی نظیر غلظت (۳) و زمان مناسب حضور در سطح تخمدان (۴)، تعداد (۵) و سطح دسترسی گیرنده (۶) و برهمکنش پایدار آن با گیرنده خود در سطح سلول‌های هدف است (۷، ۸). گیرنده LH جزء خانواده گیرنده‌های جفت شده با پروتئین جی بوده (۹) و پیام LH را از طریق پیامبر ثانویه آدنوزین مونوفسفات حلقوی منتقل می‌نماید (۱۰، ۳). LHR دارای یک دومین^۲ درون سلولی، هفت دومین عرض‌غشایی و یک دومین برون‌غشایی است که محل اتصال LH می‌باشد (۱۱).

چندشکلی^۳ و ایزوفروم‌های^۴ مختلف LHR از جمله تغییرات ژنتیکی می‌باشند که می‌توانند بر عملکرد LH و متعاقباً بازدهی تولیدمثلی تأثیرگذار باشند. ارسال و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی‌های LHR و تعداد تلقیح

1. Luteinizing hormone
2. Domain
3. Polymorphism
4. Splicing

منجر به آبستنی در گاوهای شیری نژاد هلشتاین ترکیه وجود دارد (۱۲). در مطالعه دیگری لیرون و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند جهش در ژن LHR می‌تواند زمان بلوغ را در گوساله‌های نر نژاد آنگوس تحت تأثیر قرار دهد (۱۳). وریس و یانا و همکاران (۲۰۱۷) مشاهده کردند بیان ایزوفروم‌های متفاوت LHR یک نقش کلیدی در کنترل اثرات LH بر رشد فولیکولی و تخمک‌گذاری در گاو شیری دارد (۱۴). همچنین وریس و یانا همکاران (۲۰۱۹) در مطالعه دیگری نشان دادند الگوی بیان ایزوفروم‌های مختلف LHR در سطح سلول‌های گرانولوزا از جمله عوامل تأثیرگذار بر پاسخ گاوهای نژاد جیبر به برنامه سوپراوولاسیون می‌باشد (۸). یانگ و همکاران (۲۰۱۲) نیز وجود ارتباط معنی‌دار بین چندشکلی‌های ژن LHR و میزان پاسخ به سوپراوولاسیون را در گاوهای هلشتاین چینی نشان دادند (۳). عبیدی و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی ژن LHR و وقوع کیست تخمدانی در گاو شیری وجود دارد و استفاده از آن را در برنامه‌های اصلاح نژادی به منظور گزینش دام پیشنهاد کردند (۱۵). نتایج مطالعه یانگ و همکاران (۲۰۱۲) ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی ژن LHR و میزان غلظت هورمون محرک فولیکولی را در برنامه سوپراوولاسیون گاو هلشتاین چینی گزارش کردند (۳).

وجه اشتراک مطالعات اشاره‌شده در خصوص ارتباط بین چندشکلی‌ها و ایزوفروم‌های LHR با عملکرد تولیدمثلی این است که دامنه مطالعات فوق صرفاً ژنتیکی، محدود به معرفی ژنوتیپ و ایزوفروم و بررسی ارتباط معنی‌داری آنها با صفات تولیدمثلی بوده است و در هیچکدام از مطالعات فوق تأثیر جهش و نوع ایزوفروم بر ساختار سوم پروتئین LHR و تمایل برهمکنش آن با LH موردتوجه قرار نگرفته است. با توجه به اینکه اولین مرحله برای شروع اثر LH اتصال

گردید. ساختارهای ایجاد شده با استفاده از نرم‌افزار گرافیکی پایمول نسخه ۲,۵,۱ و نمودار رام‌چاندرا ن مورد مشاهده و ارزیابی قرار گرفتند. همچنین شاخص‌های مختلف فیزیکی-شیمیایی پروتئین‌های مدل شده مانند نقطه ایزوالکتریک، وزن مولکولی، تعداد دنباله‌های منفی و مثبت و میزان آبگریزی با استفاده از ابزار ProtParam در پایگاه Expasy (http://expasy.org/tools/protparam.html) محاسبه گردید (۲۳).

پیش‌بینی نواحی درگیر در میانکشی LH و LHR: به‌منظور تعیین نواحی درگیر در میانکشی LH و LHR دو مسیر قابل‌دسترس بود. مسیر اول استفاده از سرور CPORT (www.milou.science.uu.nl/services/CPORT) و دیگری الگوگیری از ساختار کریستال برهمکنش‌های مشابه با برهمکنش LH و LHR بود در این مطالعه مسیر دوم به منظور انتخاب نواحی درگیر در میانکشی استفاده شد و برای این منظور ساختار کریستال برهمکنش هورمون محرک فولیکولی به همراه گیرنده اختصاصی‌اش با کد IXWD انتخاب گردید. که با توجه به تشابه بالای توالی آمینواسیدی و ساختار کریستالی هورمون‌های LH و هورمون محرک فولیکولی و گیرنده‌های آن‌ها (۲۴) به نظر می‌رسید انتخاب مناسبی باشد.

بررسی میانکشی LH و LHR: به‌منظور بررسی میانکشی LH و LHR از سرور HADDOCK 2.4 استفاده گردید (۲۵). HADDOCK با توجه به این‌که در حین فرآیند داکینگ از نواحی درگیر در میانکشی استفاده می‌نماید، یک روش داکینگ داده-محور می‌باشد لذا نتایج حاصل از آن با نتایج بدست آمده از آزمایشگاه مطابقت بالایی دارد (۲۶، ۲۷). نتایج بدست آمده از داکینگ با استفاده از نرم‌افزار LigPlot⁺ 1.4.5 به منظور بررسی جزئیات برهمکنش مورد بررسی قرار گرفت (۲۸).

آن به LHR در سطح سلول هدف است لذا به نظر می‌رسد که تغییر ساختار سوم LHR می‌تواند در پایداری برهمکنش آن با LH و متعاقباً مقدار بروز اثرات آن مؤثر باشد. روش داکینگ مولکولی^۹، یکی از روش‌های مورد استفاده در مدل‌سازی مولکولی است و با استفاده از آن می‌توان جایگاه اتصال لیگاند به پروتئین و نیز شدت پیوند بین آن‌ها را پیش‌بینی و محاسبه نمود (۱۶، ۱۷ و ۱۸). هدف پژوهش حاضر مقایسه چندشکلی‌های مختلف LHR از نظر ساختار سوم پروتئینی و تمایل برهمکنش آن‌ها با LH به کمک داکینگ مولکولی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

آنالیز چندشکلی‌های پروتئین LHR: با مراجعه به پایگاه داده‌های پروتئین در NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) توالی‌های اسیدآمینو گزارش شده برای پروتئین LHR در Bos Taurus شناسایی شد. هم‌ردیف‌سازی چندتایی توالی‌ها^{۱۰} با استفاده از نرم‌افزار مگا نسخه ۵ (۱۹) و الگوریتم Clustalw صورت پذیرفت. در ادامه تعداد جهش‌ها و جایگاه‌هایی که در آن‌ها جایگزینی آمینواسیدی رخ داده معلوم گردید و نتایج با استفاده از نرم‌افزار Bioedit (۲۰) مشاهده و مورد آنالیز قرار گرفت.

مدل‌سازی ساختار سوم LHR: با توجه به عدم وجود ساختار برای پروتئین LHR گاوی در پایگاه اطلاعاتی PDB (www.rcsb.org) ساختار کریستال آن به روش همولوژی مدلینگ پیش‌بینی شد. برای این منظور از ساختار کریستال پروتئین LHR انسانی به‌عنوان الگو استفاده شد (۲۱). در ادامه ساختار کریستال چندشکلی‌های مختلف پروتئین LHR گاوی با استفاده از نرم‌افزار مدلر نسخه ۹,۱۵ (۲۲) تعیین

1. Molecular Docking
2. Multiple Sequence Alignment

نتایج و بحث

نتایج مربوط به آنالیز چندشکلی های پروتئین LHR در شکل ۱ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می شود جایگزینی مربوط به اسید آمینه شماره ۲۱۰ تنها جایگزینی بین چندشکلی های مختلف LHR می باشد که در آن لایزین ۲۱۰ جایگزین گلوتامین ۲۱۰ شده است. بررسی جزئی تر ساختار LHR نشان داد که جایگزینی صورت گرفته در دومین خارج سلولی LHR است (شکل ۱). در مطالعه ای که توسط

هامنی و همکاران (۲۰۱۷) بر روی چندشکلی های گیرنده پروتئین هورمون محرک فولیکولی گاوی (دارای تشابه ساختاری بسیار بالایی با LHR است) صورت گرفت ۳ جایگزینی در دومین خارج سلولی آن که محل اتصال هورمون محرک فولیکولی است مشاهده شد (۲۹). در مطالعات متعددی وجود چندشکلی در LHR گزارش شده است و بیشتر آنها در ناحیه اگزون ۱۱ ژن LHR که کدکننده دومین میان غشائی است می باشند (۳۰).

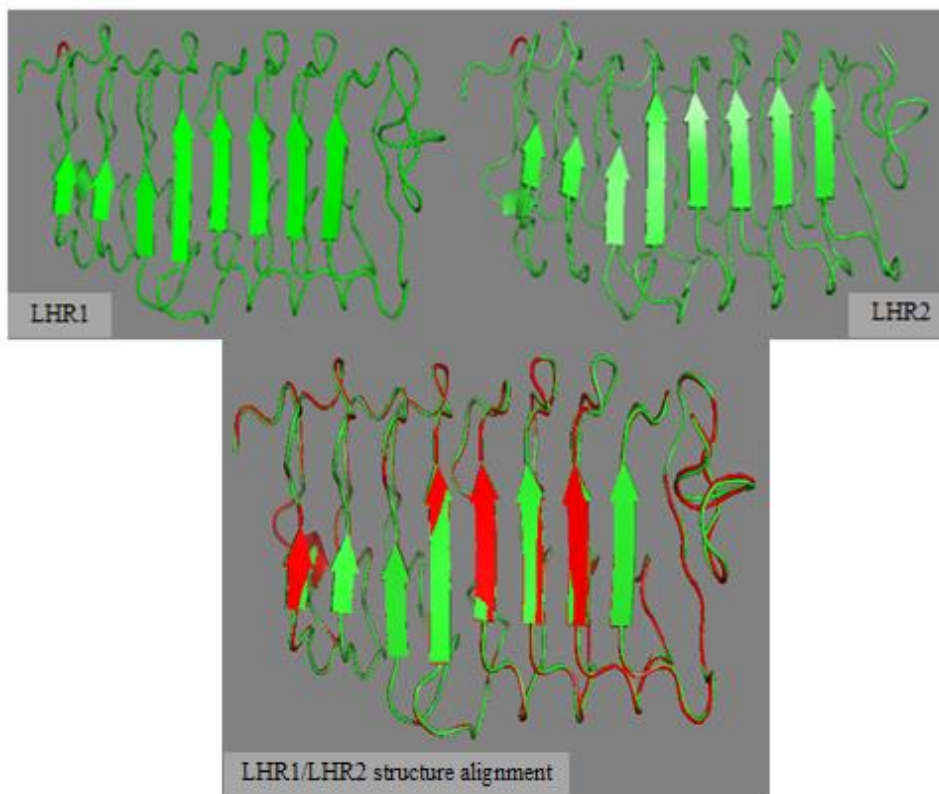
```
LHR1 ALRPAPCPPEPCSCPPDGLRCPGPGQAGLSRSLTYLPIKVIKIPVPSQAFRGLNEVIKIEISQSDSLEKIEANAFDNLNLSEI
LHR2 ALRPAPCPPEPCSCPPDGLRCPGPGQAGLSRSLTYLPIKVIKIPVPSQAFRGLNEVIKIEISQSDSLEKIEANAFDNLNLSEI
*****
LHR1 LIQNTKNLVHIEAGFTNLPRLKYLKYSICNTGIIKLPDVTKIFSSSEFNFILEICDNLHITTIIPRNFQGMNNEISITLKYLG
LHR2 LIQNTKNLVHIEAGFTNLPRLKYLKYSICNTGIIKLPDVTKIFSSSEFNFILEICDNLHITTIIPRNFQGMNNEISITLKYLG
*****
LHR1 NGFEEIQSHAFNGTTLISLELKENARLEKMHNDAFRGATGPSILDISSTQLQA
LHR2 NGFEEIQSHAFNGTTLISLELKENARLEKMHNDAFRGATGPSILDISSTQLQA
*****
```

شکل ۱- مقایسه بین توالی آمینواسیدی دومین خارج سلولی چندشکلی های LHR1 و LHR2، جایگزینی لایزین (Lys₂₁₀) با گلوتامین (Gln₂₁₀)

Figure 1. Comparison between the amino acid sequence of the extracellular domain of LHR1 and LHR2 polymorphisms, replacement of lysine (Lys₂₁₀) with glutamine (Gln₂₁₀)

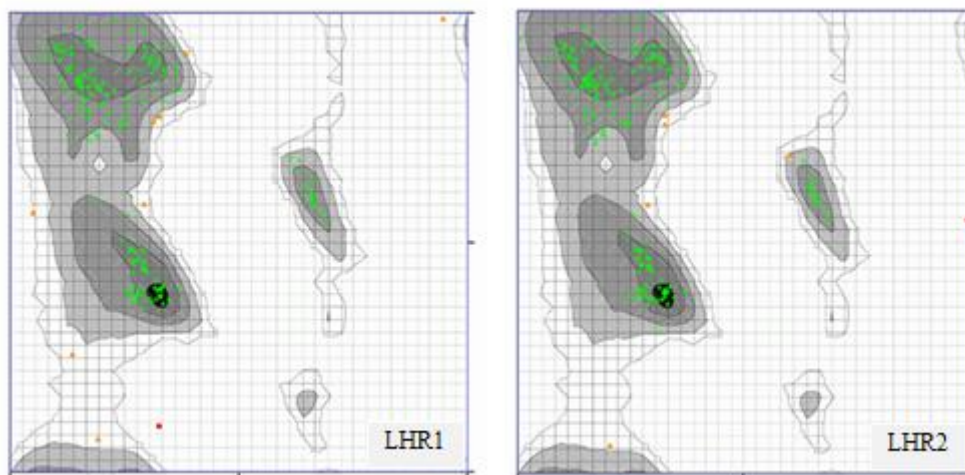
از آنجائی که ساختار سوم پروتئین تابع توالی اسید آمینه آن می باشد، لذا این احتمال وجود دارد که چندشکلی های مختلف یک پروتئین ساختارهای سوم متفاوت و متعاقباً عملکرد متفاوت داشته باشند. از این رو ساختار دو چندشکلی LHR در این مطالعه به منظور بررسی تاثیر جایگزینی اسید آمینه بر ساختار LHR مدل سازی شد. با توجه به اینکه جایگزینی اسید آمینه در دومین خارج سلولی LHR رخ داده است مدل سازی محدود به این ناحیه بود. به دو روش مختلف میزان صحت و کیفیت مدل های پیش بینی شده

مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. روش اول مبتنی بر شاخص نمره پیش بینی ارائه شده توسط مدلر بود. برای هر دو چندشکلی، از بین ۵ مدل ساخته شده بهترین مدل توسط مدلر براساس کمترین میزان شاخص نمره پیش بینی انتخاب گردید. مقایسه بین مدل های انتخاب شده برای چندشکلی های مورد بررسی نشان داد که اختلاف معنی داری در شاخص نمره پیش بینی، ساختار دوم و سوم (شکل ۲) بین آنها قابل مشاهده نمی باشد.



شکل ۲- ساختار سوم پیش‌بینی شده برای LHR1 و LHR2 با استفاده از نرم افزار Modeller (تصویر بالا) و alignment کردن ساختار آنها با یکدیگر (تصویر پایین)

Figure 2. The third structure was predicted for LHR1 and LHR2 using Modeller software (above image) and alignment of their structure with each other (bottom image)



شکل ۳- نقشه رامچاندران ساختارهای سوم پیش‌بینی شده برای LHR1 و LHR2. نقاط قرمز و سبز رنگ در هر نمودار به ترتیب نشان دهنده یک اسید آمینه با زاویه phi و psi غیرمجاز و مجاز هستند

Figure 3. Ramachandran map of the third structures was predicted for LHR1 and LHR2. The red and green dots represent an acceptable and unacceptable amino acid with an angle of phi and psi, respectively on each diagram

به چندشکلی‌های مورد مطالعه آورده شده است. جایگزینی گلوتامین با لایزین منجر به بازی‌تر شدن چندشکلی نوع ۲ (LHR2) در مقایسه با چندشکلی نوع ۱ (LHR1) گردید که با توجه به ماهیت بازی اسید آمینه لایزین کاملاً طبیعی به نظر می‌رسد. همچنین جایگزینی این اسید آمینه کاهش بسیار جزئی قطبیت LHR2 را به همراه داشت.

روش دوم استفاده از نمودار رامانچاندران بود (شکل ۳). چنانچه دیده می‌شود نقاط قرمز غیرمجاز که نشان‌دهنده اسید آمینه با زاویه فی و سای غیرمجاز است در هر دو نمودار بسیار اندک‌اند و این بدان معنی است که هر دو مدل از کیفیت بالای ساختاری برخوردارند و بسیار شبیه به هم می‌باشند. در جدول ۱ شاخص‌های فیزیکی-شیمیایی مربوط

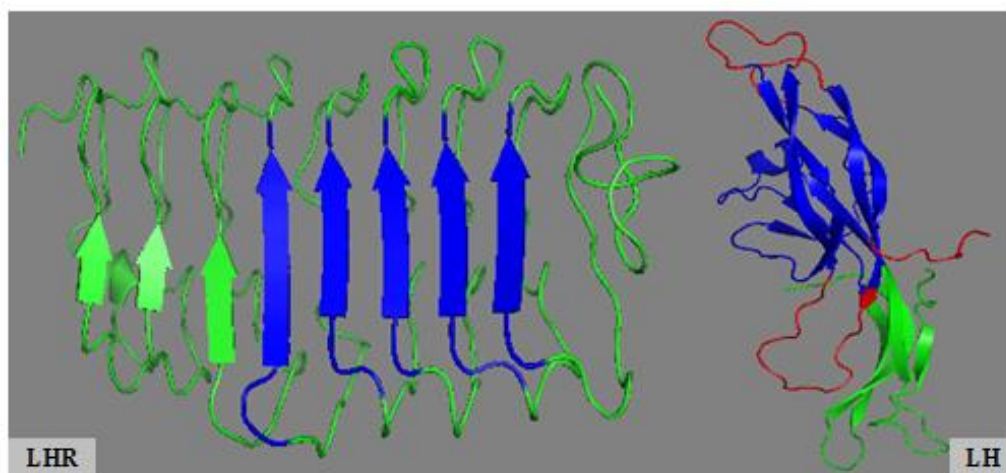
جدول ۱- شاخص‌های فیزیکی-شیمیایی مربوط به LHR1 و LHR2

Table 1. Physico-chemical indices related to LHR1 and LHR2

GRAVY	تعداد آمینواسیدهای منفی و مثبت (Number of negative and positive amino acids)	نقطه ایزوالکتریک (Isoelectric point)	وزن مولکولی (دالتون) (Molecular weight/dalton)	پروتئین (Protein)
-0.098	40	5.75	23416.85	LHR1
-0.01	41	5.98	23416.89	LHR2

جیانگ و همکاران (۲۰۱۲) (۲۴) و گرزسیک و همکاران (۲۰۱۵) (۲۱) تعیین شد که در شکل ۴ نشان داده شده است.

الگوی اتصال LH به LHR با استفاده از تکنیک داکینگ و در بستر سرور HADDOCK انجام پذیرفت. نواحی درگیر در برهمکنش بر اساس مطالعه



شکل ۵- نواحی درگیر در میانکشی LH با LHR بر اساس مطالعه Jiang و همکاران [۲۴]، نواحی آبی رنگ در هر دو ساختار نشان‌دهنده نواحی درگیر در برهمکنش می‌باشند

Figure 5. Areas involved in the interaction of LH with LHR, according to the Jiang et al. [24] study, the blue areas in both structures represent the areas that are involved in the interaction

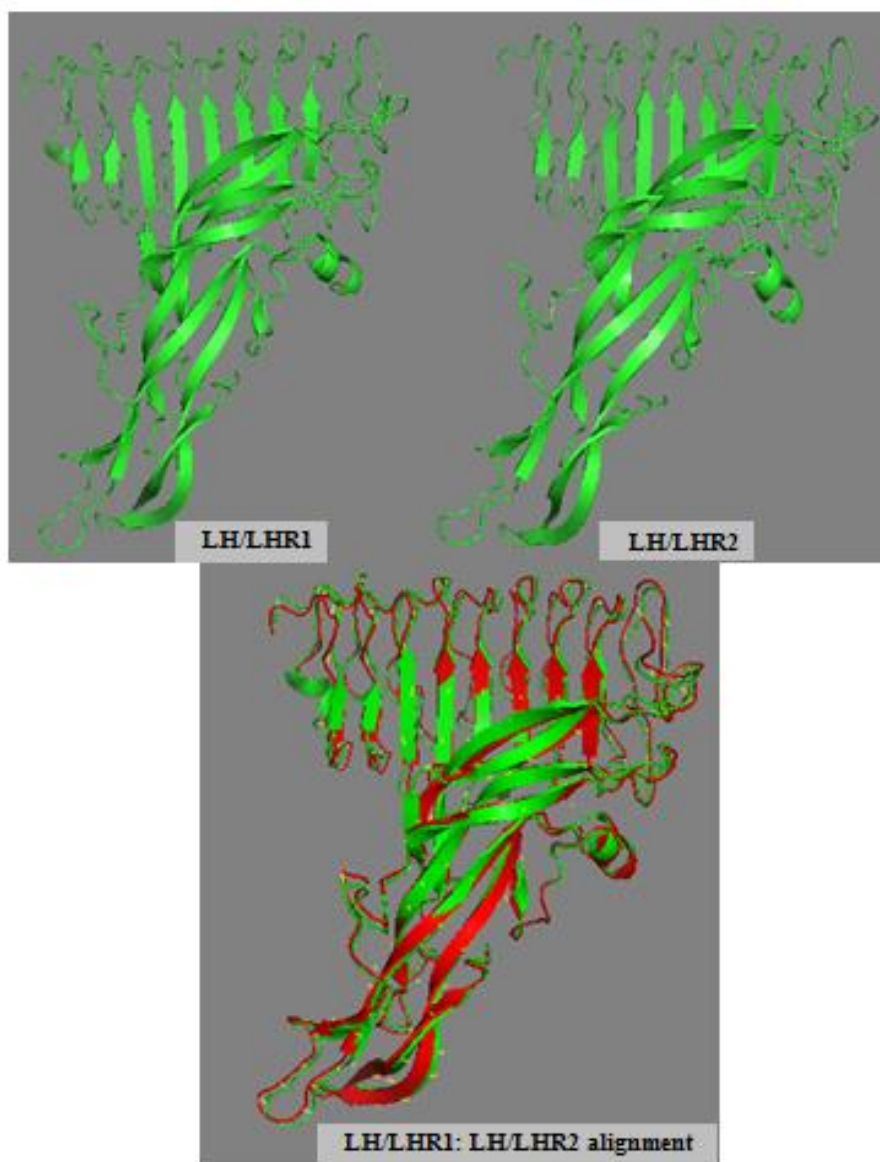
شبیه‌سازی شده انجام شد که میزان این پارامترها برای بهترین داکینگ از کمپلکس LH-LHR1 به صورت زیر است:

Z-score= -1.7
HADDOCK-score= -50.1+/- 10

ارزیابی کیفیت برهمکنش‌ها و انتخاب بهترین آنها بر اساس موقعیت مناسب LH، حداقل میزان انرژی مورد نیاز برای اتصال LH، میزان Z-Score و HADDOCK-score از بین رده‌تره‌های

وجود نداشت (شکل ۵) و LH ژست فضائی قابل قبول و یکسانی جهت میانکنش با LHR در هر دو چندشکلی نشان داد. انرژی اتصال برای کمپلکس LH-LHR1 و LH-LHR2 به ترتیب ۱۷۲,۵۸- و ۲۴۲,۶- به دست آمد.

و برای کمپلکس LH-LHR2 به صورت زیر می باشد:
 Z-score= -2.4
 HADDOCK-score= -74.5 +/- 11.4
 بر پایه نتایج داکینگ تفاوتی در الگوی اتصال و تمایل اتصال LH به LHR بین دو چندشکلی مورد ارزیابی در نواحی پیش بینی شده درگیر در برهمکنش



شکل ۵- نتایج داکینگ LH با چندشکلی های LHR1 و LHR2 و alignment کردن کمپلکس آنها با یکدیگر
Figure 5. Docking results of LH with LHR1, LHR2 polymorphisms, and alignment of their complexes with each other

داشته است. با توجه به اینکه از یک سو چندشکلی های LHR1 و LHR2 تنها در یک اسیدآمین

در نگاه اول این طور به نظر می آید جایگزینی اسیدآمین به تفاوت در تمایل برهمکنش را به همراه

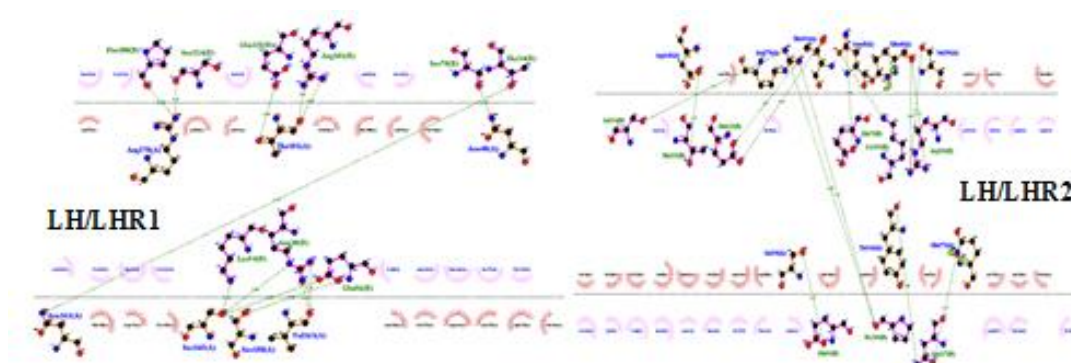
تمایل اتصال هورمون محرک فولیکولی به آن را تحت تاثیر قرار داد (۲۹) که با نتایج مطالعه ما هم‌خوانی ندارد. عدم این همخوانی را می‌توان به نوع پروتئین مورد بررسی و نوع و مکان اسیدآمینه‌های جایگزین شده مرتبط دانست. جهت بررسی بیشتر جزئیات برهمکنش خروجی LigPlot⁺ بررسی شد (شکل ۶). تعداد برهمکنش‌های هیدروژنی در کمپلکس‌های LH-LHR1 و LH-LHR2 به ترتیب ۱۳ و ۱۴ بدست آمد. شماره و نوع اسیدآمینه‌های درگیر در پیوند هیدروژنی به تفکیک هر کمپلکس در شکل آورده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود برخی اسیدآمینه‌ها در ناحیه برهمکنش هر دو کمپلکس LH-LHR1 و LH-LHR2 مشترک هستند. عدم تشابه سایر اسیدآمینه‌های درگیر در ناحیه برهمکنش کمپلکس‌ها را می‌توان به تفاوت جهت‌گیری LH نسبت به هر کدام از چندشکلی‌ها نسبت داد.

(اسیدآمینه شماره ۲۱۰) اختلاف دارند و از سوی دیگر تفاوت چشمگیری بین خصوصیات فیزیکوشیمیایی آنها وجود ندارد، این اختلاف انرژی اتصالی را نمی‌توان به جایگزینی اسیدآمینه ارتباط داد و احتمالاً این اختلاف مرتبط با تفاوت جزئی در جهت‌گیری LH نسبت به LHR می‌باشد. پیش‌بینی جهت‌گیری و اعمال آن در فرآیند داکینگ برای مولکول‌های کوچک بسیار با دقت از مولکول‌های بزرگ نظیر پروتئین‌ها می‌باشد لذا در ارزیابی و تفسیر نتایج داکینگ معیار اصلی و اولیه جهت‌گیری مناسب و قابل قبول لیگاند در مقابل گیرنده می‌باشد و در مراحل بعدی میزان انرژی اتصال مورد بررسی قرار می‌گیرد. در مطالعه هامنی و همکاران (۲۰۱۷) که با هدف بررسی تاثیر چندشکلی‌های گیرنده هورمون محرک فولیکولی گاوی بر مقدار تمایل آن‌ها به هورمون محرک فولیکولی صورت گرفت جایگزینی‌های اسیدآمینه‌ای صورت گرفته الگو و

جدول ۲- اسیدآمینه‌های درگیر در پیوند هیدروژنی کمپلکس‌های LHR1 و LHR2

Table 2. Amino acids involved in hydrogen bonding of LHR1 and LHR2 complexes

پیوند هیدروژنی (hydrogen bond)	برهمکنش (interaction)
Arg178:Pro100, Arg178:Ser124, Thr181:Glu125, Thr181:Arg101, Asn48:Ser78, Asn161:Thr34, Ser165:Lys54, Ser165:Arg30, Ser165:Glu56, Ser150:Glu56, Val163: Arg30	LH-LHR1
Asp145:Thr155, Arg178:Ser124, Arg178:Pro124, Arg178:Glu125, Thr181:Glu125, Asn48:Glu79, Asn48:Lys103, Gln46:Arg101, Ser180:Arg101, Ser150:Glu56, Tyr143:Asn127, Gln173:Asn127	LH-LHR2



شکل ۶- نتایج آنالیز LigPlot⁺ از جزئیات برهمکنش LH با چندشکلی‌های LHR1 و LHR2

Figure 6. Results of LigPlot⁺ analysis of the details of LH interaction with LHR1 and LHR2 polymorphisms

به‌طورکلی نتایج این مطالعه نشان داد جهش
معنی‌داری بر ساختار سوم، خواص فیزیکیوشیمیایی و
صورت گرفته در اسیدآمینه گیرنده LHR تأثیر
تمایل برهمکنش آن با لیگاند LH ندارد.

منابع

1. Perera-Marin, G., Murcia, C. and Gonzalez-Padilla, E. 2007. Luteinizing hormone (LH) isoforms in ruminants: characterization and physiological relevance. *Animal Reproduction Science*, 101:187-207.
2. Stevenson, J. and Britt, J. 2017. A 100-year review: Practical female reproductive management. *Journal of Dairy Science*, 100:10292-10313.
3. Yang, W.-C., Tang, K.-Q., Li, S.-J., Chao, L.-M. and Yang, L.-G. 2012. Polymorphisms of the bovine luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor (LHCGR) gene and its association with superovulation traits. *Molecular Biology Reports*, 39:2481-2487.
4. Wohlres-Viana, S., Arashiro, E., Reis, D.D.L., Fernandes, L., Peixoto, M., Machado, M. and Viana, J. 2016. Polymorphisms and alternative splicing of the luteinizing hormone receptor of dairy cattle. *Genetics and Molecular Research*, 25:44-50.
5. Minegishi, T., Nakamura, K., Yamashita, S., Ikeda, S. and Kogure, K. 2008. Regulation of human luteinizing hormone receptor in the ovary. *Reproductive Medicine and Biology*, 7:11-16.
6. Sun, L.-P., Du, Q.-Z., Song, Y.-P., Yu, J.-N., Wang, S.-J., Sang, L. and Zhang, S.L. 2012. Polymorphisms in luteinizing hormone receptor and hypothalamic gonadotropin-releasing hormone genes and their effects on sperm quality traits in Chinese Holstein bulls. *Molecular Biology Reports*, 3:7117-7123.
7. Ginther, O., Bergfelt, D., Beg, M. and Kot, K. 2001. Follicle selection in cattle: role of luteinizing hormone. *Biology of Reproduction*, 64:197-205.
8. Wohlres-Viana, S., Arashiro, E., Minare, T., Fernandes, C., Grazia, J., Siqueira, L. and Viana, J. 2019. Differential expression of LHCGR and its isoforms is associated to the variability in superovulation responses of Gir cattle. *Theriogenology*, 126:68-74.
9. Liang, H., Chen, L., Liu, Z. and Zhou, X. 2012. Expression of functional follicle-stimulating hormone receptor and luteinizing hormone/chorionic gonadotrophin receptor in oviduct and uterus in prepubertal gilts. *Livestock Science*, 148:74-80.
10. Ogiwara, K., Fujimori, C., Rajapakse, S. and Takahashi, T. 2013. Characterization of luteinizing hormone and luteinizing hormone receptor and their indispensable role in the ovulatory process of the medaka. *PLoS One*, 8:48-54.
11. Dufau, M., Tsai-Morris, C.H., Hu, Z.Z. and Buczko, E. 1990. Structure and regulation of the luteinizing hormone receptor gene. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 53:283-291.
12. Arslan, K., Akyüz, B., Akçay, A., Ilgar, E.G., Macun, H.C. and Çınar, M.U. 2017. Association of number of artificial inseminations per pregnancy in holstein dairy cows with polymorphism in luteinizing hormone receptor and follicle stimulating hormone receptor genes. *Slovenian Veterinary Research*, 54:91-98.
13. Lirón, J.P., Prando, A.J., Fernández, M.E., Ripoli, M.V., Rogberg-Muñoz, A., Goszczynski, D.E. and Giovambattista, G. 2012. Association between GNRHR, LHR and IGF1 polymorphisms and timing of puberty in male Angus cattle. *BMC Genetics*, 13:26-40.
14. Wohlres-Viana, S., Arashiro, E., Machado, M., Camargo, L., Siqueira, L., Palhao, M. and Viana, J. 2017. Intrafollicular oestradiol production, expression of the LH receptor (LHR) gene and its isoforms, and early follicular deviation in *Bos indicus*. *Reproduction, Fertility and Development*, 29:1958-1970.
15. Abdi, Z., Rafat, S., Firouzmandi, M., Moghadam, G. and Shoja, J. 2017. Polymorphisms of the bovine luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor (LHCGR) gene and its association with ovarian follicular cysts. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 168:143-150.

16. Bartuzi, D., Kaczor, A., Targowska-Duda, K. and Matosiuk, D. 2017. Recent advances and applications of molecular docking to G protein-coupled receptors. *Molecules*, 22:340.
17. Dar, A. and Mir, S. 2017. Molecular docking: approaches, types, applications and basic challenges. *Journal of Analytical and Bioanalytical Techniques*, 8:55-60.
18. Meng, X.-Y., Zhang, H.-X., Mezei, M. and Cui, M. 2011. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current Computer-aided Drug Design*, 7:146-157.
19. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28:2731-2739.
20. Hall, T. 1999. BIOEDIT: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/ NT.
21. Grzesik, P., Kreuchwig, A., Rutz, C., Furkert, J., Wiesner, B., Schuelein, R. and Krause, G. 2015. Differences in signal activation by LH and hCG are mediated by the LH/CG receptor's extracellular hinge region. *Frontiers in Endocrinology*, 6:140-150.
22. Eswar, N., Webb, B., MartiRenom, M.A., Madhusudhan, M., Eramian, D., Shen, M.y. and Sali, A. 2006. Comparative protein structure modeling using Modeller. *Current Protocols in Bioinformatics*, 15:561-570.
23. Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Wilkins, M.R., Appel, R.D. and Bairoch, A. 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. *The proteomics protocols handbook*, 571-607.
24. Jiang, X., Liu, H., Chen, X., Chen, P.-H., Fischer, D., Sriraman, V. and He, X. 2012. Structure of follicle-stimulating hormone in complex with the entire ectodomain of its receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109:12491-12496.
25. Van Zundert, G., Rodrigues, J., Trellet, M., Schmitz, C., Kastiris, P., Karaca, E. and Bonvin, A. 2016. The HADDOCK2. 2 web server: user-friendly integrative modeling of biomolecular complexes. *Journal of Molecular Biology*, 428:720-725.
26. De Vries, S.J., Melquiond, A.S., Kastiris, P.L., Karaca, E., Bordogna, A., van Dijk, M. and Bonvin, A.M. 2010. Strengths and weaknesses of data driven docking in critical assessment of prediction of interactions. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 78:3242-3249.
27. Dominguez, C., Boelens, R. and Bonvin, A.M. 2003. HADDOCK: a protein- protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *Journal of the American Chemical Society*, 125:1731-1737.
28. O'Boyle, N.M., Banck, M., James, C.A., Morley, C., Vandermeersch, T. and Hutchison, G.R. 2011. Open Babel: An open chemical toolbox. *Journal of Cheminformatics*, 3:1-14.
29. Hamny, H., Jalaluddin, M., Aisyah, S., Wahyuni, S. and Aulanni'am, A.A. 2017. Polymorphism of follicle stimulating hormone receptor influences the 3D structure and its binding pattern to FSH in *Bos taurus*. *Indian Journal of Animal Research*, 51:1-7.
30. Hastings, N., Donn, S., Derecka, K., Flint, A. and Woolliams, J. 2006. Polymorphisms within the coding region of the bovine luteinizing hormone receptor gene and their association with fertility traits. *Animal Genetics*, 37:583-585.
31. Yu, Y., Pang, Y., Zhao, H., Xu, X., Wu, Z., An, L. and Tian, J. 2012. Association of a missense mutation in the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor gene (LHCGR) with superovulation traits in Chinese Holstein heifers. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 3:1-5.

